

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

6

(11)Publication number : 53-092729

(43)Date of publication of application : 15.08.1978

(51)Int.Cl. C07C103/52
C07C103/52
C12D 13/06
C12D 13/06

(21)Application number : 52-007279

(71)Applicant : TOYO SODA MFG CO LTD
SAGAMI CHEM RES CENTER

(22)Date of filing : 27.01.1977

(72)Inventor : ISOWA YOSHIKAZU
OMORI MUNEKI
MORI KAORU
ICHIKAWA TETSUYA
NONAKA YUJI
KIHARA KEIICHI
KOYAMA KIYOTAKA
SATO HEIJIRO
NISHIMURA JIITSU

(54) ADDUCT OF DIPEPTIDE DERIVATIVES AND AMINO ACID DERIVATIVES AND PROCESS FOR THEIR PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: Adducts of dipeptide esters and aminocarboxylic acid esters I(R1 is aliphatic oxycarbonyl, nuclear substd-benzyloxycarbonyl, etc.; R2 is methyl, isopropyl, etc.; R3 is lower alkoxy, benzyloxy, etc.; n is 1 or 2), e.g. adduct of Nbenzyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalaninemethylester with L-phenylalaninemethylester.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨日本国特許庁
公開特許公報

⑩特許出願公開
昭53—92729

⑪Int. Cl. ² C 07 C 103/52 C 12 D 13/06	識別記号 1 0 1 1 0 3 1 0 5 1 0 7	⑫日本分類 16 C 64 16 B 651 36(2) D 35 36(2) D 251	庁内整理番号 7330—43 6956—43 7110—49 7110—49	⑬公開 昭和53年(1978) 8 月 15 日 発明の数 5 審査請求 未請求 (全 22 頁)
---	--	---	--	--

⑭ジペプチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加化合物及びその製造法

⑯特 願 昭52—7279
⑯出 願 昭52(1977) 1 月 27 日
⑯発 明 者 磯和義員
東京都世田谷区船橋 2 丁目 20 番 6 号
同 太森宗樹
東京都豊島区雑司谷 2 丁目 5 番 9 号
同 森馨
相模原市西大沼 4 丁目 4 番 1 号

⑯発 明 者 市川哲也
相模原市栄町 3 丁目 16 番地
同 野中悠次
新南陽市大字富田 4560 番地
同 木原啓一
新南陽市大字富田 4560 番地
同 小山清孝
新南陽市大字富田 4560 番地
同 佐藤平次郎
新南陽市大字富田 4560 番地
⑯出 願 人 東洋曹達工業株式会社
新南陽市大字富田 4560 番地
最終頁に続く

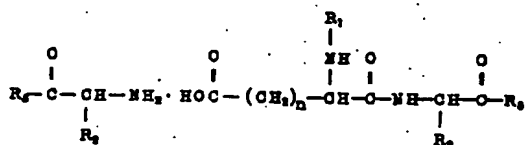
明細書の抄写(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

ジペプチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加化合物及びその製造法。

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式

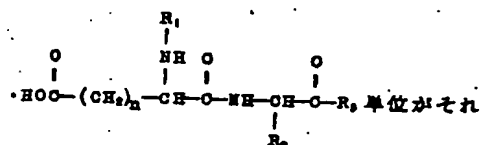
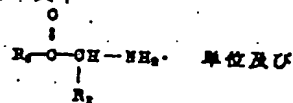


で表わされる化合物(式中 R_1 は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基、又は芳香族スルフィニル基であり、 R_2 はメチル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、 R_3 は低级アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基であり、 n は 1 又は 2 で

ある) で表わされる化合物。

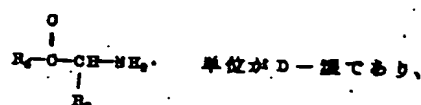
(2) R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が 1 である特許請求の範囲第 1 項記載の化合物。

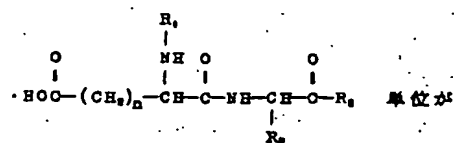
(3) 式中



ぞれ L-型及び L L-型である特許請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の化合物。

(4) 式中



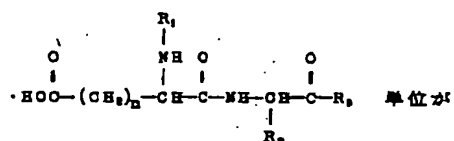


単位が L-L-型である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の化合物

(6) 式中



単位が D-型及び L-型で

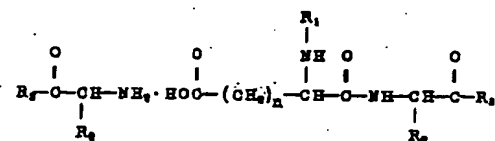


単位が L-L-型である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の化合物。

(7) 一般式



で表わされる M-型



で表わされるジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物(式中 R_1 , R_2 , R_3 及び n は前記同様の意味である)の製造法。

(7) R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が1である特許請求の範囲第6項記載の製造法。

(8) 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第6項又は第7項記載の製造法。

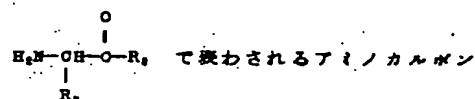
(9) 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第6項乃至第8項のいずれかの項記載の製造法。

(10) 反応を pH 5 乃至 8 で行う特許請求の範囲第6項乃至第9項記載の製造法。

特開 昭53-92729 (2)

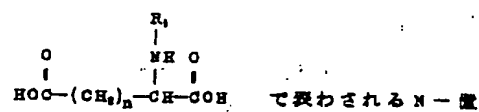
換モノアミノジカルボン酸(式中 R_1 は脂肪族

オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、 n は1又は2である)と、一般式

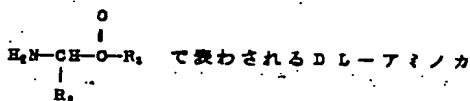


酸エステル(式中 R_1 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、 R_2 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基である)とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、更に生成したジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させ、これを分離することを特徴とする、一般式

(11) 一般式

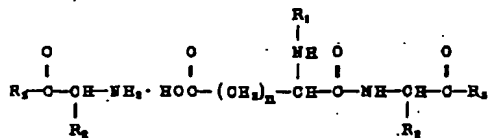


で表わされる M-型換-L-モノアミノジカルボン酸(式中 R_1 は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、 n は1又は2である)と、一般式



ルボン酸エステル(式中 R_1 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、 R_2 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基である)とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成した L-L-型ジペプチドエステルと D-型又は D-L-型に含むアミノカ

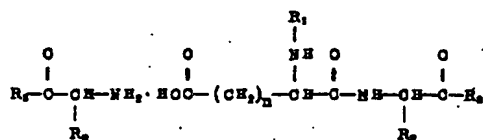
ルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離することを特徴とする、一般式



で表わされる LL-型ジベブテドエステルと D-型又は D-型に含むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物 (式中 R_1 , R_2 , R_3 及び n は前記同様の意味である) の製造法。

- 04 R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が 1 である特許請求の範囲第 1 項記載の製造法。
- 05 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第 1 項又は第 1 2 項記載の製造法。
- 06 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第 1 項乃至第 1 3 項のいずれかの項記載の製造法。

シ基である) とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成した LL-型ジベブテドエステルと L-型アミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離し、水性媒体中より N-置換-D-モノアミノジカルボン酸を回収することを特徴とする、一般式



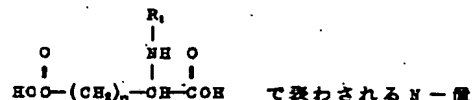
で表わされる LL-型ジベブテドエステルと L-型アミノカルボン酸エステルとの付加化合物 (式中 R_1 , R_2 , R_3 及び n は前記同様の意味である) の製造法。

- 04 R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が 1 である特許請求の範囲第 1 項記載の製造法。

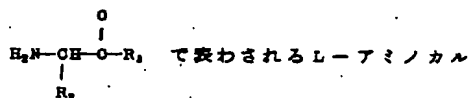
特開 昭 53-92729 (3)

04 反応を pH 5 乃至 8 で行なう特許請求の範囲第 1 項乃至第 1 4 項のいずれかの項記載の製造法。

04 一般式



で表わされる N-置換-D,L-モノアミノジカルボン酸 (式中 R_1 は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、 n は 1 又は 2 である) と、一般式



で表わされる L-アミノカルボン酸エステル (式中 R_2 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基、又はベンジル基であり、 R_3 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基、又はベンズヒドリルオキ

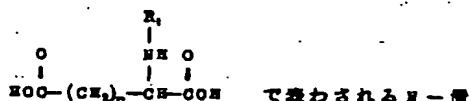
シ基である) とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成した LL-型ジベブテドエステルと L-型アミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離し、水性媒体中より N-置換-D-モノアミノジカルボン酸を回収することを特徴とする、一般式

04 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第 1 項乃至第 1 3 項のいずれかの項記載の製造法。

05 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第 1 項乃至第 1 3 項のいずれかの項記載の製造法。

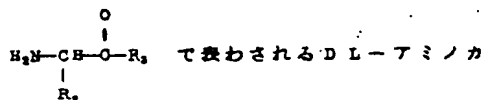
06 反応を pH 5 乃至 8 で行なう特許請求の範囲第 1 項乃至第 1 3 項のいずれかの項記載の製造法。

04 一般式



で表わされる N-置換-D,L-モノアミノジカルボン酸 (式中 R_1 は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、

ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、 n は1又は2である)と、一般式



ルボン酸エステル(式中 R_1 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基、又はベンジル基であり、 R_2 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基、又はベンズヒドリルオキシ基である)とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成したL-L型ジペプチドエステルとD-型又はD-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離し、水性媒体中よりN-置換-D-モノアミノジカルボン酸を回収することを特徴とする、一般式

特許請求の範囲第22項乃至第25項記載の製造法。

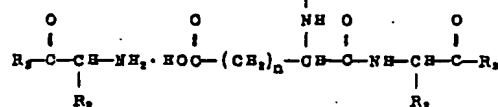
- 03 反応をpH5乃至8で行なう特許請求の範囲第22項乃至第24項のいずれかの項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はジペプチド誘導体とアミノ酸誘導体との新規な付加化合物及びその製造法に関するものであり、更に詳しくはN-置換モノアミノジカルボン酸エステルとアミノカルボン酸エステルとのジペプチドにアミノカルボン酸の付加した新規な化合物、及びその製造法に関するものである。

ババインやキモトリプシンの様な蛋白分解酵素が蛋白分解(ペプチド結合の切断)の逆反応であるペプチド結合の生成反応に関与し得ることは古くから知られている。例えばBergmanらはババインを用いてアミドの合成を行なっている。またFrutonはアミノ基をベンゾイル基等で保護したロイシン等のモノアミノカルボン酸とカルボキシル基をアミド又はアニリドとして保護したロイシンやグリシンを、ババインやキモトリプシンを用いてペプチド結合させ得ることを明らかにしている("Advances in Protein Chemistry", 第5巻, 33頁(1949), Academic Press Inc., New York, N. Y.)。最近では本発明者のうち磯和らがアミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護したアミノ酸とカルボキシル基をエステル化したアミノ酸とをババイン、プロリシン、スプテリシンBPN等の酵素を用いてペプチド合成反応を行なつたことが報告されている(日本化学会第35秋期大会予稿集, 482頁及び486頁(1976), 日本化学会)。これらの方法では生成物を採取するため、反応生成物が水溶性基を失つて水に不溶となり析出すること(これはペプチド生成反応を進行させるためにも必要である)ことを利用する。従つて生成物にならず水溶性を保存する様な基が残る場合、例えば出発物質としてアスパラギン酸の様に β 位に更にカルボキシル基がある場合には、この観点からもその様な基を保護基によつて保護

特開 昭53-92729 (4)



で表わされるL-L型ジペプチドエステルとD-型又はD-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物(式中 R_1 , R_2 , R_3 及び n は前記同様の意味である)の製造法。

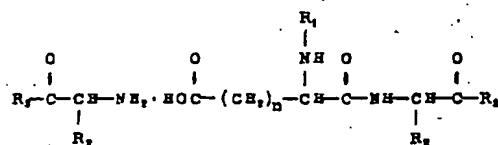
- 03 R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり n が1である特許請求の範囲第22項記載の製造法。
- 04 N-置換-D-L-モノアミノジカルボン酸とD-L-アミノカルボン酸エステルとをモル比ではほぼ同量用いる特許請求の範囲第22項又は第23項記載の方法。
- 05 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第22項乃至第24項のいずれかの項記載の製造法。
- 06 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特

ル基をアミド又はアニリドとして保護したロイシンやグリシンを、ババインやキモトリプシンを用いてペプチド結合させ得ることを明らかにしている("Advances in Protein Chemistry", 第5巻, 33頁(1949), Academic Press Inc., New York, N. Y.)。最近では本発明者のうち磯和らがアミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護したアミノ酸とカルボキシル基をエステル化したアミノ酸とをババイン、プロリシン、スプテリシンBPN等の酵素を用いてペプチド合成反応を行なつたことが報告されている(日本化学会第35秋期大会予稿集, 482頁及び486頁(1976), 日本化学会)。これらの方法では生成物を採取するため、反応生成物が水溶性基を失つて水に不溶となり析出すること(これはペプチド生成反応を進行させるためにも必要である)ことを利用する。従つて生成物にならず水溶性を保存する様な基が残る場合、例えば出発物質としてアスパラギン酸の様に β 位に更にカルボキシル基がある場合には、この観点からもその様な基を保護基によつて保護

するのが好ましいと考えられていた。

本発明者らはこの様な系について深く考究した結果、アスパラギン酸やグルタミン酸の様なモノアミノジカルボン酸のアミノ基を保護した（N末端保護）ものを出発物質として用いるとジペプチド自体は析出しないが、相手側の出発物質、即ちカルボキシル基をエステル化したアミノ酸（アミノカルボン酸エステル）として特定のものを選ぶと生成するジペプチドとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物が析出することを発見して本発明を完成した。

即ち本発明は、一般式



で表わされる化合物（式中R₁は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基、又は芳香族スルフィニル基であり、R₂

（2,4,6-(CH₃)₃-φ-CH₂-O-CO-）等のその核置換誘導体基、ベンゾイル基（φ-CO-）；p-トルエンホルミル基（p-CH₃-φ-CHO-）等の芳香族ホルミル基；又はo-ニトロスルフィニル基

（o-NO₂-φ-CHO-）等の芳香族スルフィニル基である。

R₂について云えば、これがメチル基のときはアラニンの、イソプロピル基のときはバリンの、イソブチル基のときはロイシンの、イソアミル基のときはイソロイシンの、ベンジル基のときはフェニルアラニンの骨格をそれぞれ持つものである。

またR₂はアルコール残基であつて、メトキシ基（CH₃O-）、エトキシ基（C₂H₅O-）、プロポキシ基（C₃H₇O-）、ブトキシ基（C₄H₉O-）などの低級アルコキシ基；ベンジルオキシ基；又はベンズヒドリルオキシ基である。

本発明の化合物、例えばその典型的な例であるN-ベンジルオキシカルボニル-アスパラチル-フェニルアラニンメチルエステルとフェニルアラニンメチルエステルとから生ずる化合物について云えば、第1図（実施例1で得られた本発明の化

特開 昭53-92729 (5)

はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、R₂は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基であり、nは1又は2である）で表わされる新規かつ有用な化合物を提供するものである。

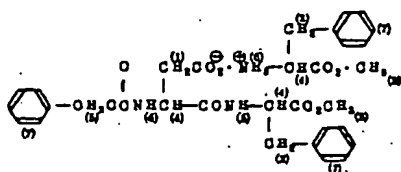
本発明はまた上記一般式で表わされる化合物（以下本発明の化合物という）の製造法を提供するものである。

本発明の化合物はnが1のときアスパラギン酸の、nが2のときグルタミン酸の骨格を含むものである。

本発明の化合物の式中、R₁は第3級ブチルオキシカルボニル基（(CH₃)₃C-O-CO-）、第3級アミルオキシカルボニル基（(CH₃)₃C(C₂H₅)-O-CO-）の様な脂肪族オキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基（φ-CH₂-O-CO-）若しくはp-メトキシベンジルオキシカルボニル基（p-CH₃-O-φ-CH₂-O-CO-）3,5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル基（3,5-(CH₃)₂-φ-CH₂-O-CO-）、2,4,6-トリメトキシベンジルオキシカルボニル基

合物の赤外吸収スペクトル図）に示す様に、赤外吸収スペクトル図において、3260 cm⁻¹ にN-H伸縮に、3000~3200 cm⁻¹ にC-H伸縮に、1740 cm⁻¹ にエステルのC=Oに、1720 cm⁻¹ にクレタンのC=Oに、1660 cm⁻¹ にアミド第I吸収に1630 cm⁻¹ にカルボキシレートに、1540 cm⁻¹ にアミド第II吸収に、1430及び1450 cm⁻¹ にO-H変角に、1390 cm⁻¹ にカルボキシレートに、1220~1290 cm⁻¹ にC-O-O伸縮及びアミド第III吸収に、1050 cm⁻¹ にフェニル面内変角に、740及び695 cm⁻¹ にモノ置換ベンゼン環面外変角に、それぞれ由来する吸収がみられる。

また同じ化合物の核磁気共鳴スペクトルを第2図に示すがその特徴はδ: 2.75 ppm, 3.02 ppm, 3.61 ppm, 3.7 ppm, 4.4~4.8 ppm, 5.05 ppm, 5.62 ppm, 及び7.3 ppmにあり、これらはそれぞれ下記の様に帰属させることができる。

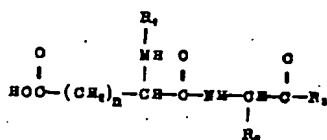


- (a) $\delta = 2.7.5$ ppm (2H)
 (b) $\delta = 3.0.2$ (4H)
 (c) $\delta = 3.6.1$ (3H)
 及び 3.7 (3H)
 (d) $\delta = 4.4 \sim 4.8$ (3H)
 (e) $\delta = 5.0.5$ (2H)
 (f) $\delta = 5.8.2$ (5H)
 (g) $\delta = 7.3$ (15H)

本発明の化合物の元素分析値は上記一般式の場合の計算値と極めてよい一致を示す。また塩酸等の強酸で処理した後、酢酸エチル等の有機溶剤で抽出すると有機層から酸性を示す物質が得られる。 R_1 がベンジルオキシカルボニル基、 R_2 がベンジル基、 R_3 がメトキシ基の場合について云うと、その赤外吸収スペクトルは第3図に示す様に

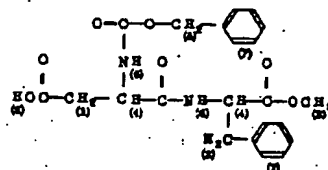
の値、即ち δ : (a) 2.7.5 ppm (2H), (b) 3.0.2 ppm (2H), (c) 3.6.1 (3H), (d) 4.4 ~ 4.8 (2H), (e) 5.0.1 (2H), (f) 5.8 (2H), (g) 7.2 (10H) 及び 8.1 (1H) もこの構造を支持する(数値の前の括弧内の数字は上記式中の括弧の中の数字に対応)。

一般的に云えばこの酸性物質はLL-型の一般式



で表わされる化合物である。本発明の化合物を塩酸等の強酸により処理し、有機溶剤で抽出すると上述した様に上記の一般式で表わされる化合物が得られるが、そのとき水相からは使用原料によりLL-型、D型又はD型に富むアミノカルボン酸が回収される。その場合上記化合物とアミノカルボン酸が当量関係となることから、本発明の化合物が前記した一般式で表わされるジペプチドエステ

特開昭53-92729 (6)
 3.350 cm^{-1} (N-H伸縮), $2.950 \sim 3.100 \text{ cm}^{-1}$ (O-H伸縮), $1.220 \sim 1.740 \text{ cm}^{-1}$ (C-Oエステル及びカルボン酸), 1.700 cm^{-1} (ウレタン), 1.660 cm^{-1} (アミド第I吸収), 1.540 cm^{-1} (アミド第II吸収), 1.430 及び 1.450 cm^{-1} (O-H変角), 1.220 , 1.240 及び 1.290 cm^{-1} (O-O-C(エステル及びアミド第II吸収), 1.020 及び 1.040 cm^{-1} (フェニル面内変角並びに 490 及び 730 cm^{-1} (モノ置換ベンゼン環面外変角)の吸収に特徴があり、このものを接触還元すると公知のLL-アスパラチル-フェニルアラニンメチルエステルと同一の物質が得られること及び元素分析値が一致する等の事実から、この酸性物質は



の構造を持つ化合物と決定した。核磁気共鳴吸収

とアミノカルボン酸エステルとの1:1の付加化合物であることが明らかとなった。

本発明の化合物はペプチド合成における中間体として極めて有用な物質である。前述した様に本発明の化合物を塩酸等の強酸で処理し有機溶剤で抽出すれば保護されたアミノ基を持つジペプチドが得られる。このものからそのアミノ基の保護基である R_1 を慣用の方法、例えば水素還元等によつて除去すれば容易にアミノ基とカルボキシ基を各1個有するジペプチドエステルとすることができ。こうして得られるジペプチドエステルは極めて有用な物質である。例えばaが1、 R_2 がベンジル基で R_3 がメトキシ基の場合であるアスパルチル-フェニルアラニンメチルエステルは甘味剤として用いることのできる物質である。

一方本発明の方法は本発明の化合物を製造する方法に関するものであつて、D-置換モノアミノカルボン酸及びアミノカルボン酸エステルを蛋白分解酵素によつてペプチド結合させ、更に生成するジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステ

ルとの付加化合物を形成させ、これを回収するものである。

即ち、一般式

$$\begin{array}{c} \text{O} & \text{NH} & \text{O} \\ | & | & | \\ \text{HOO}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$$
 で表わされる N-置換モノアミノジカルボン酸（式中 R_1 及び n は本発明の化合物のそれと同一の意味を表す）と、一般式

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{O}-\text{R}_2 \\ | \\ \text{R}_3 \end{array}$$
 で表わされるアミノカルボン酸

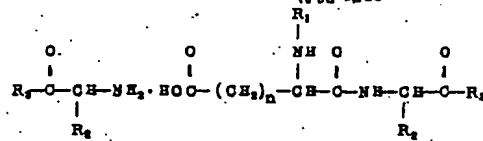
エステル（式中 R_2 及び R_3 は本発明の化合物のそれと同一の意味を表す）とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、更に生成したジペプチドエステルの付加化合物を形成させ、これを分離することを特徴とする。一般式

N-置換モノアミノジカルボン酸は相適するモノアミノジカルボン酸に慣用の方法でアミノ基の保護基 R_1 を導入することにより容易に得ることができる。

一方の出発物質であるアミノカルボン酸エステルとしては側鎖に疎水性の基を持つアミノ酸のエステルを用いるものであり、 R_2 がメチル基のときはアラニンの、イソプロピル基のときはバリンの、イソブチル基のときはロイシンの、イソアミル基のときはイソロイシンの、ベンジル基のときはフェニルアラニンのエステルである。

本発明の方法で用いる蛋白分解酵素としては活性中心に金属イオンを有する酵素即ち金属プロテアーゼが最も好ましい。その例としては微生物起源のもの、例えば、放線菌起源の中性プロテアーゼ、プロリシン、サーモライシン、コラゲナーゼ、クロタスアストロクサスプロテアーゼ等をあげることができる。粗製の酵素例えばサモアーゼなども使用できる。その原液稀するエステラーゼ等の作用を避けるため、ポタインヒビターなど

特開 昭53-92729 (7)



で表わされるジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物（式中 R_1 、 R_2 、 R_3 及び n は前記同様の意味である）の製造法である。

出発物質の N-置換モノアミノジカルボン酸は n が 1 のときアスパラギン酸の、 n が 2 のときグルタミン酸の N-置換誘導体である。

R_1 はアミノ基の保護基であつて、本発明の方法においてアミノ基を保護するものである。従つて本発明の方法の反応の間安定であることが必要であるが、後にアミノ基から離脱させる必要がある場合には、生成物の骨格に影響を与えることなく離脱できるものであることも必要である。また本発明の化合物は水性媒体から析出させて分離するので、その析出を妨害する様な基、例えばスルホン基の様な水溶性を大きく増大させる基を持つものであつてはならない。本発明の方法で用いる

の阻害剤を併用してもよい。

パペインなどのチオールプロテアーゼ、又はトリプシンなどのセリンプロテアーゼも使用不能ではないがエステラーゼ作用を併うので、エステルの加水分解が起きない様注意して反応を行なう必要がある。

本発明のペプチド生成反応は水性媒体中、好ましくは水溶液中、使用する蛋白分解酵素が酵素活性を示す pH 条件のもとで反応させるものである。本発明のペプチドとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物形成反応も pH 依存性があり、結局本発明の方法は pH 約 4 乃至約 9、最も好ましくは pH 約 5 乃至約 8 で行ふのが望ましい。従つて出発原料である N-置換モノアミノジカルボン酸及びアミノカルボン酸エステルは遊離型でも塩でもよいが、この両成分を水性媒体中に溶解したとき、この pH 条件に調整する必要がある。pH 調整剤としては塩酸、硫酸、酢酸の様な慣用の無機酸又は有機酸及び水酸化ナトリウム、水酸化カリウムの様な水酸化アルカリ、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナ

リウムのようなアルカリ炭酸塩、アンモニア、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エタノールアミンの様な有機又は無機のアミン等の使用の無機又は有機の塩基を用いることができる。

本発明の方法では放出される水素イオンの量と水酸イオンの量は当量関係にあるので、反応によるpH変動はあまりない。しかし勿論その変動を抑えるため、適当な緩衝剤を使用してもよい。工業的にはpH検出機構と連動するpH調節機構を設けて制御するのが便利である。

水性媒体としては通常水溶液を使用する。その水に可溶の有機溶剤を併用してもよい。

本発明の方法は温度10℃乃至90℃、酵素活性を維持する観点から好ましくは20℃乃至50℃で行なうものである。反応は通常約30分乃至24時間程度で完結するが、この反応時間はなんら限定的でない。

本発明の方法の両出発物質の使用濃度には格別の限定はないが、本発明の方法が本質的に生成物を析出させることに依存するものであるため、こ

料の濃度が減少し、その溶け込みが起るからである。ただしこの場合、pHの変動が起る恐れが大きいため反応の進行に応じてpH調節の必要があることが多い。

本発明の方法で使用する酵素の量もまた限定的でない。使用濃度が高ければ反応が短時間で完了するが、濃度が低いとそれだけ反応時間が長くなるだけである。しかし一般的には両出発物質(基質)1ミリモルに対して2乃至400 μ mol(5 $\times 10^{-4}$ 乃至1 $\times 10^{-3}$ ミリモル)程度、好ましくは5乃至100 μ mol(1 $\times 10^{-4}$ 乃至3 $\times 10^{-3}$ ミリモル)程度である。

本発明の方法のペプチド生成反応はL体についてのみ起り、D体はこの反応に関与しない。一方付加化合物形成のためのアミノカルボン酸エステルはL-型であるとD-型であるを問わない。従つて原料のアミノカルボン酸エステルとしてD-型を使用するとペプチド結合生成によつて溶液中のL-型アミノカルボン酸エステルが消費され、ジペプチドエステルとの付加化合物形成

の濃度は比較的高い方が望ましい。しかし生成物の付加化合物は水に対する溶解度が小さいので(γ-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパルテイル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの付加化合物の場合、20℃での溶解度0.3g/100g水程度)、可成小さい濃度でも実施が可能である。具体的には約0.001M乃至7M程度好ましくは0.1M乃至4Mである。

この両成分の使用比率も限定的でない。しかし、本発明の方法が結局はγ-置換モノアミノジカルボン酸1分子とアミノカルボン酸エステル2分子とを結合させることにあるので、この両原料は化学量論上1:2のモル比で、実際上は100:1乃至1:100、好ましくは5:1乃至1:5、最も好ましくは2:1乃至1:3のモル比で用いるものである。

本発明の両原料は必ずしもその全量が、水性媒体中に溶解していることを要せず、一部懸濁状態のものであつてもよい。反応の進行によつて両原

料は、よりD-型に富むアミノカルボン酸エステルが関与することとなる。本発明の方法の反応は基質濃度が高いとはほとんど定量的に進行するので、L-型のγ-置換モノアミノジカルボン酸1モル量に対して2モル量のDL-型アミノカルボン酸エステルを使用したときは、ほとんどDL-型のジペプチドエステルとD-型のアミノカルボン酸エステルとの付加物からなる本発明の化合物が得られる。この付加化合物はすでに述べた様に容易に両成分に分離できるので、ジペプチドエステルの製造と、アミノカルボン酸エステルの光学分割を同時に行なうことができる。分離したD-型又はD-型に富むアミノカルボン酸エステルは使用の手段でラセミ化させ、本発明の原料として循環使用することができる。

またDL-型のγ-置換モノアミノジカルボン酸とL-型のアミノカルボン酸エステルを用いればD-型のγ-置換モノアミノジカルボン酸は反応しないので水性媒体中に残り、L-型ジペプチドエステルとL-型のアミノカルボン酸エステ

ルとの付加化合物が得られる。従つて水性媒体中よりD-型のY-置換モノアミノジカルボン酸を回収すれば、ジベブテドエステルの製造とY-置換-DL-モノアミノジカルボン酸の光学分割を同時に行なうことができる。こうして回収したY-置換-D-モノアミノジカルボン酸も慣用の手段でラセミ化すれば本発明の方法の出発原料として再使用することができる。

更にまたDL-型のY-置換モノアミノジカルボン酸とDL-型のアミノカルボン酸エステルを使用すれば、同様にして水性媒体中からY-置換-モノアミノジカルボン酸を、析出するLL-型ジベブテドエステルとD-アミノカルボン酸エステルとの付加化合物からベブテドエステルとD-アミノカルボン酸を得ることができるので、ジベブテドエステルの製造と、Y-置換-DL-モノアミノジカルボン酸の光学分割及びDL-アミノカルボン酸エステルの光学分割を同時に行なうことができる。

本発明の方法によればジベブテドエステルの製

造に当り、公知技術では当然必要と考えられる側鎖カルボキシル基への保護基の導入及び除去の工程を省略できる。従つてその工程に伴う原料、製品等の損失を避けることができる。また適当な条件を選べば収率が極めて高い。

本発明の方法では使用原料としてDL-型が使用できる。しかも通常の酵素を用いる方法ではD-型は反応に関与しないとしても、無用のものであり、原料の損失につながるが、本発明の方法ではジベブテドの析出剤として有効に利用でき、しかも回収可能である。

本発明の方法では更にまたY-置換-DL-アミノジカルボン酸及びDL-アミノカルボン酸エステルの光学分割を同時に行なうことができる。

以下本発明を実施例について更に詳細に説明する。

実施例1

Y-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸1.335g(5ミリモル)及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩1.078g(5ミリモル)を内容積約30mlのフラスコにとり、水20mlを加えて溶解し、アンモニア水(7重量%)でpH6に調整した。この溶液にサーマライシン50mgを加えて36乃至40℃で1夜間振とうした。析出した沈殿を収集し、水40mlで水洗後乾燥し、融点117乃至120℃を示す微細な針状晶114.5mgを得た(L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩を基準とする、Y-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルの1:1付加化合物としての収率75.5%)。

このものを酢酸エチル-α-ヘキサン混合溶液から再結晶して得た物質の物性及び元素分析結果は：

融点：120~124℃

(α)_D²⁰ +2.1 (C=1, メタノール)

元素分析

C₂₂H₂₈N₂O₆としての計算値(%) 実例値(%)

C:	63.24	63.15
H:	6.13	6.15
N:	6.97	7.00

また赤外吸収スペクトル図を第1図に、核磁気共鳴吸収スペクトル図を第2図に示す。

こうして得た物質1.45gを塩酸(1N)40mlに溶解し、酢酸エチル30mlで3回抽出し抽出液を混合、水20mlで3回洗浄した。得られた酢酸エチル溶液に無水硫酸マグネシウムを加えて乾燥した。この溶液を濃縮し、ロータリウムを加えて再結晶して結晶性物質0.40gを得た。このものの物性及び元素分析結果は：

融点111.5~125℃

(α)_D²⁰:-15.3 (C=1, メタノール)

元素分析	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₄ として の計算値(%)	実測値(%)
C:	61.67	61.52
H:	5.65	5.65
N:	4.54	4.57

またこの物質の赤外吸収スペクトル図を第3図に、核磁気共鳴スペクトル図を第4図に示す。これらの結果はL-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルのアミノ基をベンジルオキシカルボニル化して得られる物質と一致した。

チル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物1.504gを得た(L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩基準で収率92.1%) (融点104乃至113℃)。

実施例3

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸及びL-フェニルアラニンメチルエステルの使用量をそれぞれ534mg(2ミリモル)及び863mg(4ミリモル)に充てた他は実施例2に準じて反応を行ない、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物1.068gを得た(融点116乃至119℃, N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸基準で収率70.4%)。

実施例4

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン

また上述した酢酸エチル溶液での抽出の際の塩酸層と洗浄水の混合液からはL-フェニルアラニンメチルエステルを回収した。

従つて上記最初の反応で得られた物質はN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの付加化合物であり、両者の比は核磁気共鳴スペクトルから1:1であることがわかつた。

実施例2

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸1.335g(5ミリモル)及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩1.078g(5ミリモル)を内容積約30mlのフラスコにとり、水10mlを加えて溶解し、アンモニア水(7重量%)でpH6に調整した。この溶液にサモライシン50mgを加えて、38乃至40℃で1夜間振とうした。析出した沈殿をろ集し、充分に水を切つてから乾燥し、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラ

酸534mg(2ミリモル)及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩663mg(4ミリモル)を内容積約30mlのフラスコにとり水8mlを加えて溶解し、アンモニア水(7重量%)でpH6.2に調整した。この溶液にサモライシン50mgを加えて38乃至40℃で1夜間振とうした。析出した沈殿をろ集し、充分に水を切つてから乾燥し、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物1.099gを得た。(N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸基準で収率90.5%)

実施例5

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸2.622g(1ミリモル)及びL-フェニルアラニンメチルエステル537.6mg(5ミリモル)にpH7.0のマブヤルペイン緩衝液5mlを加えて溶解し、これにサモアゼ100mg及びポテトインヒビター100mgを添加して38℃で20時間振とう

うした。析出した結晶を伊集し、水洗後乾燥して N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルと L-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物を粗結晶として 580 ㎎ (融点 123 乃至 125℃, N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸基準で収率 95.5%) 得た。これをジメチルホルムアミドと水との混合溶媒 (1:1) 40 ml に溶解し、H 型強酸性陽イオン交換樹脂を加えて充分に攪拌し、樹脂を除去した後伊集液を減圧濃縮した。残査をジメチルホルムアミドに溶解したのち水を加えて N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの結晶を析出させた。得量 330 ㎎ (N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸基準で収率 77.0%), 融点 123 乃至 125℃。

実施例 6

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸 267.2 ㎎ (1 ミリモル) 及び L-フェニルアラ

ニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルと L-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物 475 ㎎ を得た (L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩基準で収率 31.3%)。このものを酢酸エチル-ロヘキサン混合溶媒から再結晶して得た結晶の物性及び元素分析値は下記の通りであつた:

融点 120~124℃

$(\alpha)_D^{25} + 2.2$ (c=1, メタノール)

元素分析	計算値 (%)	実測値 (%)
C:	63.24	63.52
H:	6.13	6.22
N:	6.97	7.04

実施例 8

pH を 5.2 とした他は実施例 7 と全く同様にして反応を行ない N-ベンジルオキシカルボニル-L-

特開 昭 53-92729 (11)

ニンメチルエステル 35.84 ㎎ (2 ミリモル) に pH 7.0 のマツキルペイン緩衝液 5 ml を加えて溶解し、これにタシナーゼ N (Tacynase N) 1.00 ㎎ 及びポタトインヒビター 1.00 ㎎ を添加して 38℃ で 6 時間振とうした。析出した結晶を伊集し、水洗後乾燥して N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルと L-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物を粗結晶として 120 ㎎ (融点 119 乃至 123℃, 収率 19.7%) 得た。これを実施例 5 に準じて強酸性陽イオン交換樹脂で処理し、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルの結晶 50 ㎎ (融点 95 乃至 105℃, 収率 11.7%) を得た。

実施例 7

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸 133.5 ㎎ (5 ミリモル) 及び L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩 107.8 ㎎ (5 ミリモル) を内容積 3.0 ml のフラスコにとり、水 4 ml を

-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルと L-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物 75.3 ㎎ を得た (L-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩基準で収率 49.5%)。

実施例 9

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸 133.6 ㎎ (0.5 ミリモル) 及び L-フェニルアラニンメチルエステル 82.6 ㎎ (0.5 ミリモル) に pH 7.0 のマツキルペイン緩衝液 2.5 ml 及びトリエタールアミン 0.07 ml を加えて溶解し (pH 6.7 とした)、これにサモアーゼ 5.0 ㎎ 及びポタトインヒビター 5.0 ㎎ を添加して 38℃ で 20 時間振とうした。析出した結晶を伊集し、水洗後乾燥して N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルと L-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物を粗結晶として 130 ㎎ (融点 115 乃至 124℃, L-フェニルアラニンメチルエステル基準で収率 85.5%) 得た。

これをジメチルホルムアミドと水との混合溶液 (1:1) 20 ml に溶解し、実施例5に準じてH型強酸性陽イオン交換樹脂による処理を行ない、N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニンメチルエステルの結晶75 mg (L-フェニルアラニンメチルエステル利用率50%基準で収率70%)を得た。

実施例10

トリエチルアミン0.07 ml に代えてN-メチルモルホリン0.05 ml を用いて実施例9に準じて反応を行ない (反応開始時 pH 6.4)、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物粗結晶120 mg (融点118乃至124℃, L-フェニルアラニンメチルエステル基準で収率78.9%)を得た。これを実施例9に準じてH型強酸性陽イオン交換樹脂による処理を行ない、N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニンメチルエステルの結晶

73.4 mg (融点106乃至118℃, 収率60.5%)を得た。

実施例13

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸540 mg (2ミリモル) 及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩863 mg (4ミリモル) を内容積約30 ml のフラスコにとり、水7 ml を加えて溶解し、アンモニア水 (7重量%) で pH 6 に調整した。この溶液にサモアール500 mg を加えて、38乃至40℃で1夜間振とうした。析出した沈殿を水70 ml で水洗、乾燥してN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物550 mg を得た (融点113乃至116℃, 収率45.3%)。

70 mg (L-フェニルアラニン利用率50%基準で収率66%)を得た。

実施例11

反応時のpHを6.5、振とう時間を1時間にした他は実施例4に準じて反応を行ない、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物920 mg を得た (収率75.8%)。

実施例12

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸534 mg (2ミリモル) 及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩863 mg (4ミリモル) を内容積約30 ml のフラスコに取り、水2 ml を加えて溶解し、水酸化ナトリウム水溶液 (1N) 5.5 ml を加えてpHを7に調整した。この溶液にサモアール50 mg を加えて38乃至40℃で2時間振とうした。析出した沈殿を伊集し、乾燥し

実施例14

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸270 mg (1ミリモル) 及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩432 mg (2ミリモル) を内容積約30 ml のフラスコ中にとり、水4 ml を加えて溶解し、アンモニア水 (7重量%) で pH 6 に調整した。この溶液にサモアール50 mg を加えて、38乃至40℃で40時間振とうした。析出した沈殿を伊集し、十分に水を切つてから乾燥して、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニルアラニンメチルエステルとL-フェニルアラニンメチルエステルとの1:1付加化合物177 mg を得た (融点103乃至112℃, 収率22.1%)。

実施例15

反応溶液に更にボナトインヒビター50 mg を加えた他は実施例14と全く同様にして反応を行ない、同一の生成物331 mg (融点105乃至117℃, 収率62.7%)を得た。

実施例 16

N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸 53.4 ㎎ (2 ミリモル) 及び DL-フェニアラニンメチルエステル塩酸塩 86.3 ㎎ (4 ミリモル) を内容量約 30 ㎖ のフラスコにとり、水 7 ㎖ で溶解し、アンモニア水 (7 重量%) で pH 6.2 に調整した。この溶液にサモライシン 50 ㎎ を加えて、38 乃至 40℃ で 1 夜間振とうした。析出した沈殿をろ過し、充分に水を切つてから乾燥し、104.5 ㎎ の結晶を得た (融点 104 乃至 108℃, N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸を基準とする、N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニアラニンメチルエステルとフェニアラニンメチルエステルの 1:1 付加化合物としての収率 86.1%)。これを酢酸エチル-ヘキサン混合溶媒から再結晶して下記物性及び元素分析値を示す物質を得た:

融点 127~135℃

($\alpha_D^{25} = -6.4$ (C=1, メタノール))

元素分析	$C_{22}H_{24}N_2O_7$ とし ての計算値 (%)	実測値 (%)
C :	61.67	61.38
H :	5.65	5.58
N :	6.54	6.29

であり、このものは N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニアラニンメチルエステルであつた。

また上記メチレンジクロリドで抽出した抽出液の水層に炭酸水素ナトリウムを加えて pH 7 とし、メチレンジクロリド 30 ㎖ で 3 回抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し塩化水素ガスを約 10 分間吹込んでからメチレンジクロリドを蒸発し、エチルエーテルを加えて再結晶した。D-フェニアラニンメチルエステル塩酸塩 29.0 ㎎ を得た (このものの融点 149 乃至 151℃; (α_D^{25} : +2.8 (C=1, メタノール); 赤外吸収スペクトル及び核磁気共鳴吸収スペクトルは L-体と一致)。従つて上記の推定は正しく、本実施例の反応で得られたものは N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニアラニンメチルエステル

元素分析

特開 昭 53-92729 (13)
 $C_{22}H_{24}N_2O_7$ とし
ての計算値 (%) 実測値 (%)

O :	63.24	63.52
H :	6.13	6.19
N :	6.97	6.92

またこの物質の赤外吸収スペクトル及び核磁気共鳴吸収スペクトルは第 1 図及び第 2 図と全く同じ特徴を示すのでこのものは N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニアラニンメチルエステルと D-フェニアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物であると推定された。この物質 80.0 ㎎ を 40 ㎖ の塩酸 (1N) に溶解し、メチレンジクロリド 30 ㎖ で 3 回抽出し、メチレンジクロリド層を水洗し、無水硫酸マグネシウムで脱水し、更にメチレンジクロリドを蒸発によつて除去したのち固形分を酢酸エチル-ヘキサン混合溶媒から再結晶した。得られた結晶は 45.0 ㎎ で、その物性及び元素分析の結果は、

融点 124~132℃

($\alpha_D^{25} = -15.3$ (C=1, メタノール))

と D-フェニアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物であつた。

実施例 17

N-ベンジルオキシカルボニル-DL-アスパラギン酸 106.9 ㎎ (4 ミリモル) 及び L-フェニアラニンメチルエステル塩酸塩 86.3 ㎎ (4 ミリモル) を内容量約 30 ㎖ のフラスコにとり、水 2 ㎖ を加えて溶解し、アンモニア水 (7 重量%) で pH 6 に調整した。この溶液にサモライシン 50 ㎎ を加えて 38 乃至 40℃ で 2 時間振とうした。析出した沈殿をろ過し、水 20 ㎖ で洗浄後乾燥して N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラチル-L-フェニアラニンメチルエステルと L-フェニアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物 78.7 ㎎ を得た (融点 105 乃至 110℃, N-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸を基準で収率 64.8%)。

この物を酢酸エチル-ヘキサン混合溶媒から再結晶したものは融点 121 乃至 125℃。

$(\alpha)_D^{25} : 7.2$ ($c=1$, メタノール) を示した。

一方反応残液からは D-型に富む D-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸を回収することができた。

実施例 18

L-フェニルアラニンメチルエステルに代えて D-L-フェニルアラニンメチルエステルを用いて実施例 17 と同様に処理し反応させ、D-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸と D-フェニルアラニンメチルエステルとの 1:1 付加化合物 75.6% を得た (融点 10.5 乃至 11.1°C , D-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸基準で収率 62.3%)。

この物を酢酸エチル- α -ヘキサン混合溶媒から再結晶したものは融点: 12.6 乃至 13.4°C 。

$(\alpha)_D^{25} : -4.5$ ($c=1$, メタノール) を示した。

一方反応残液からは D-型に富む D-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸を回収することができた。

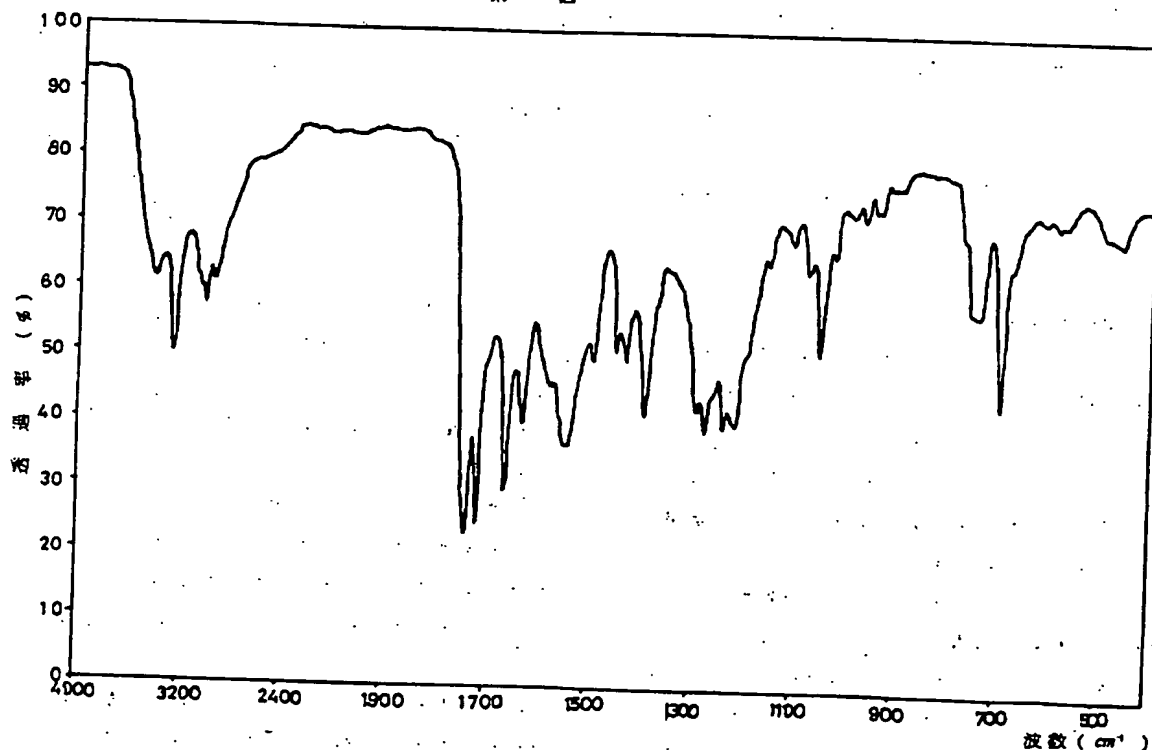
4. 図面の簡単な説明

特開 昭53-92729(14)

第 1 図は実施例 1 で得た本発明の化合物の赤外吸収スペクトルを示す図、第 2 図は同じ化合物の核磁気共鳴吸収スペクトルを示す図、第 3 図はこの化合物からアミノカルボン酸エステル単位を除去した化合物の赤外吸収スペクトルを示す図、第 4 図は同化合物の核磁気共鳴吸収スペクトルを示す図である。

特許出願人 財団法人 相模中央化学研究所
同 (代表出願人) 東洋電通工業株式会社

第 1 図

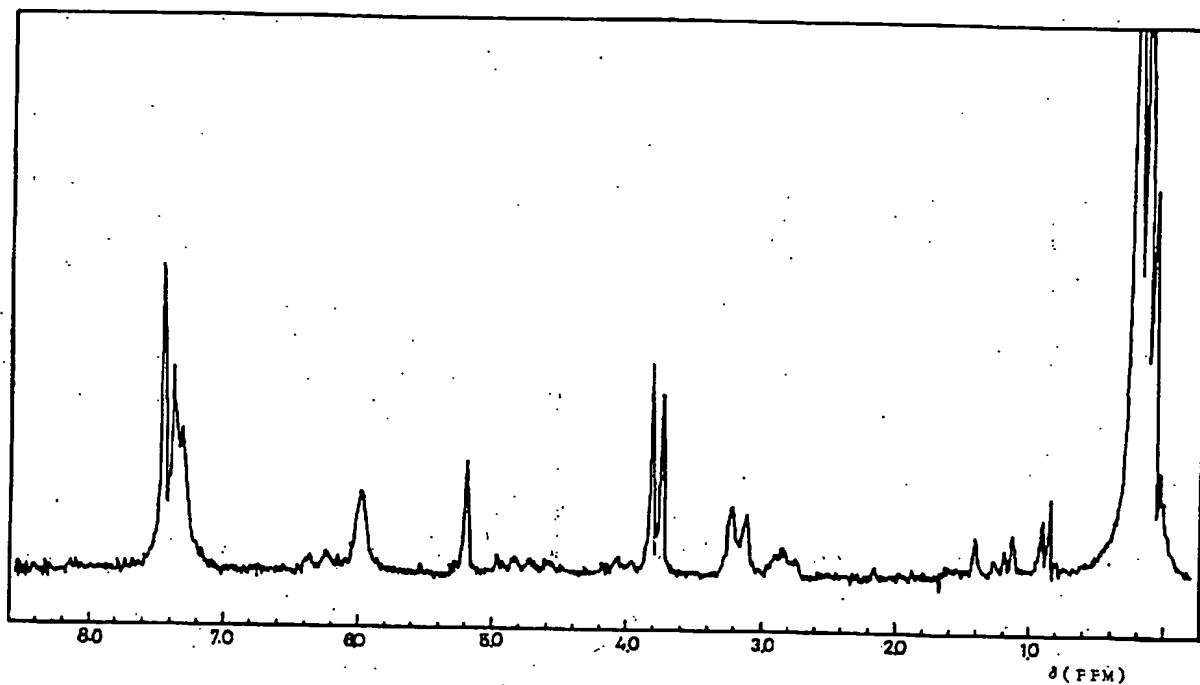


特許出願人 相模中央化学研究所

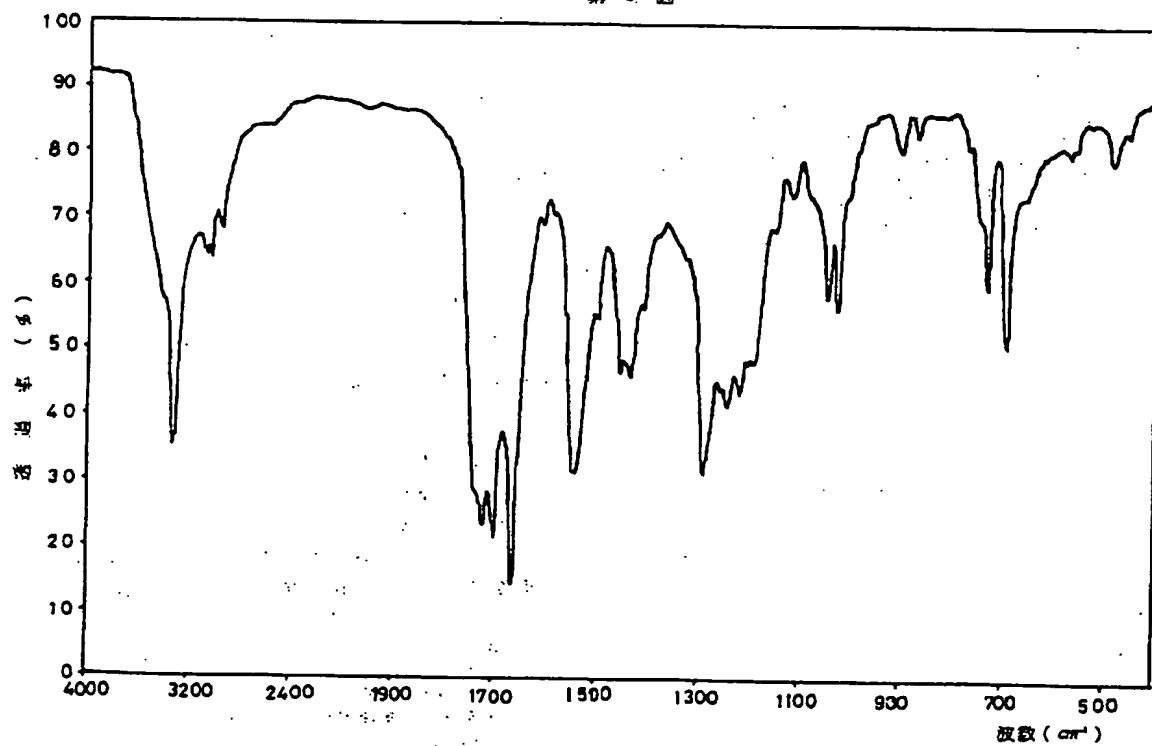
第 2 图

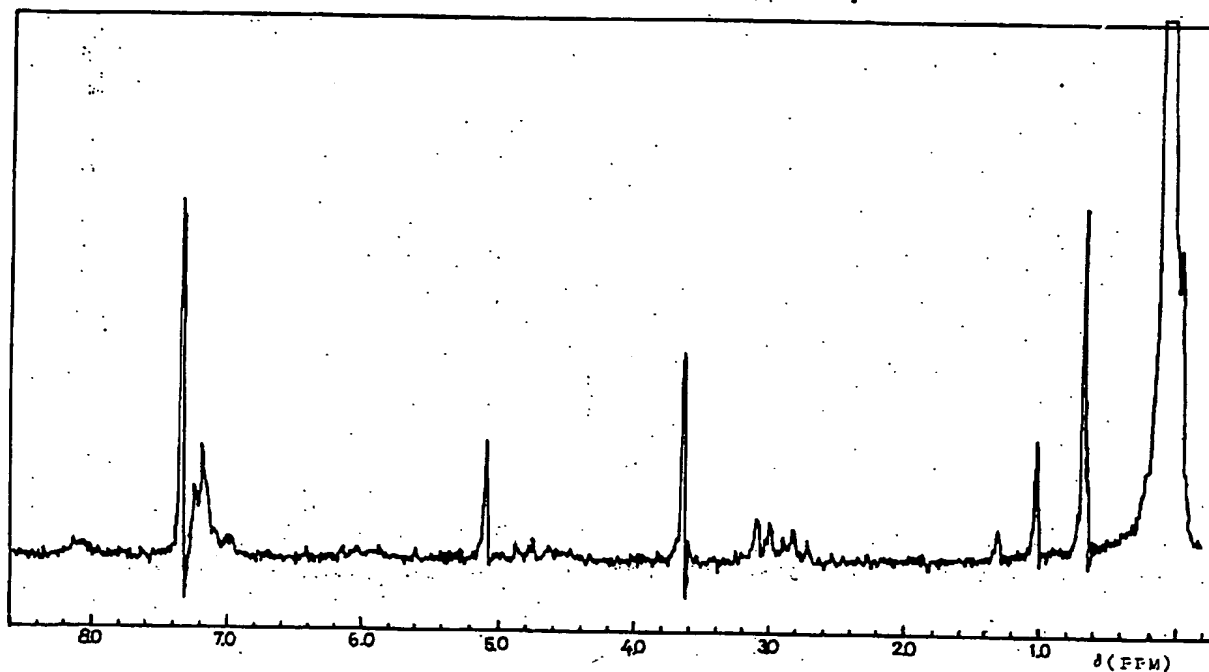
溶剂: CDCl_3

特图 53-92729 (15)



第 3 图





手 続 補 正 書

昭和52年 3 月24日

第1頁の続き

②発 明 者 西村磁哲

新南陽市大字富田4560番地

⑦出 願 人 財団法人相模中央化学研究所
東京都千代田区丸の内1丁目4
番5号

特許庁長官 片 山 石 郎 殿

1.事件の表示

昭和52年特許願第 7279号

2.発明の名称

ジペプチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加
化合物及びその製造法

3.補正をする者

事件との関係 特許出願人(代表特許出願人)

住所 郵便番号 746

山口県新南陽市大字富田4560番地

名称 (330)東洋曹達工業株式会社

代表者 青 木 周 吉

(通称名)

郵便番号107

東京都港区赤坂1丁目7番7号(東宝ビル)

東洋曹達工業株式会社 特許情報部

電話番号 東京(555)3311

4. 補正命令の日付 自発補正

特開 昭53-92729(17)
手続補正書

昭和52年10月18日

5. 補正により増加する発明の数 なし

特許庁長官 熊谷 善二 殿

6. 補正の対象

明細書全文（内容に変更なく、タイプ印書による明細書に補正するもの）

1. 事件の表示

昭和52年特許願第7279号

2. 発明の名称

ジペプチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加化合物及びその製造法

7. 補正の内容

別紙の通り

3. 補正をする者

事件との関係 代表特許出願人

住所 郵便番号 744

山口県新南陽市大字宮田4560番地

名称 (350) 東洋曹達工業株式会社

代表者 青木 周 吉

(通称名)

郵便番号 107

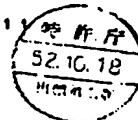
東京都港区赤坂1丁目7番7号(東京ビル)

東洋曹達工業株式会社 特許情報部

電話番号 東京(585)3511

4. 補正命令の日付 自発補正

5. 補正により増加する発明の数 なし



6. 補正の対象

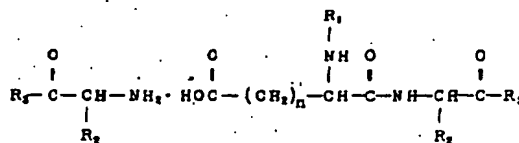
明細書の特許請求の範囲の欄

2. 特許請求の範囲

(i) 一般式

7. 補正の内容

別紙のとおり



8. 添付書類の目録

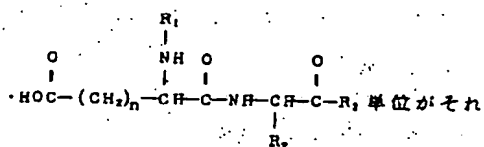
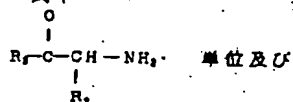
補正後の特許請求範囲の全文を記載した書面

で表わされる化合物（式中 R_1 は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基、又は芳香族スルフィニル基であり、 R_2 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、 R_3 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基であり、 n は1又は2である）

(ii) R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が1である特許請求の範囲第1項記載

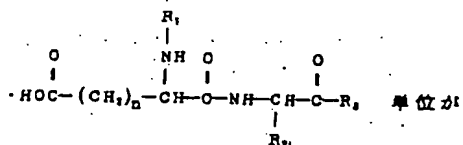
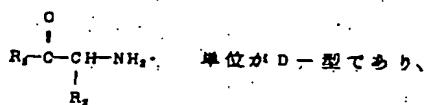
の化合物。

(3) 式中

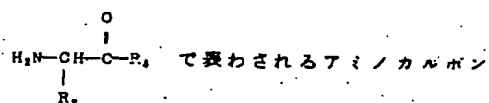


ぞれ L-型及び L-L-型である特許請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の化合物。

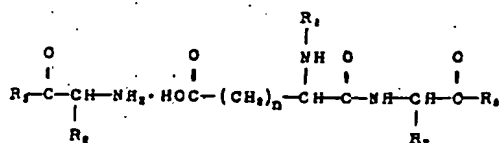
(4) 式中



ル基、芳香族スルホニル基又は芳香族スルフィニル基であり、 n は 1 又は 2 である) と、一般式



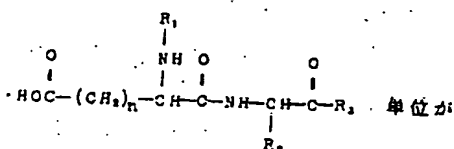
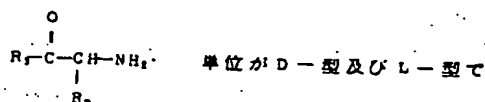
酸エステル (式中 R_1 はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、 R_2 は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基である) とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、更に生成したジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させ、これを分離することを特徴とする、一般式



特開 昭53-92729(18)

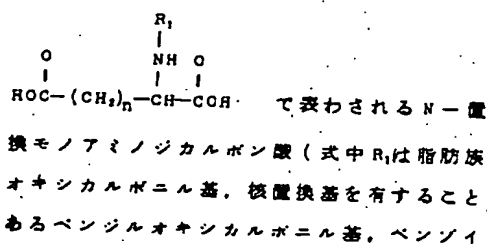
L-L-型である特許請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の化合物

(5) 式中



L-L-型である特許請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の化合物。

(6) 一般式



で表わされるジペプチドエステルとアミノカルボン酸エステルとの付加化合物 (式中 R_1 , R_2 , R_3 及び n は前記同様の意味である) の製造法。

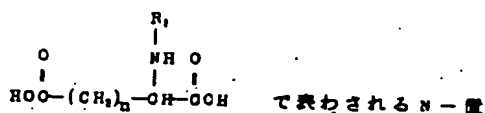
(7) R_1 がベンジルオキシカルボニル基であり、 R_2 がベンジル基であり、 R_3 がメトキシ基であり、 n が 1 である特許請求の範囲第 6 項記載の製造法。

(8) 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第 6 項又は第 7 項記載の製造法。

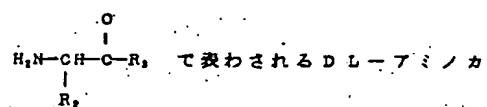
(9) 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第 6 項乃至第 8 項のいずれかの項記載の製造法。

(10) 反応を pH 5 乃至 8 で行う特許請求の範囲第 6 項乃至第 9 項記載の製造法。

(11) 一般式



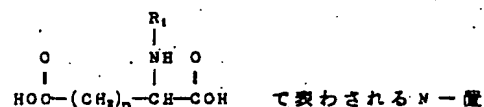
換-L-モノアミノジカルボン酸(式中R₁は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、nは1又は2である)と、一般式



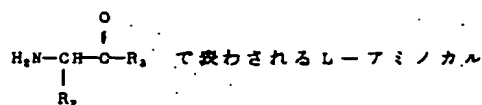
で表わされるD-L-アミノカルボン酸エステル(式中R₁はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基又はベンジル基であり、R₂は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基又はベンズヒドリルオキシ基である)とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成したL-L-型ジペプチドエステルとD-型又はD-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離することを特徴とする、一般式

製造法。

00 一般式

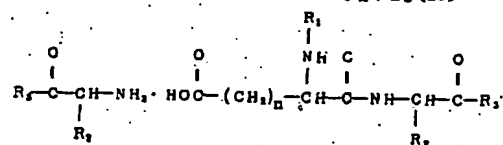


で表わされるN-置換-D-L-モノアミノジカルボン酸(式中R₁は脂肪族オキシカルボニル基、核置換基を有することあるベンジルオキシカルボニル基、ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、nは1又は2である)と、一般式



で表わされるL-アミノカルボン酸エステル(式中R₁はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基、又はベンジル基であり、R₂は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基、又はベンズヒドリルオキシ基である)とを水性媒体中蛋白分解酵素の

特開 昭53--92729(19)



で表わされるL-L-型ジペプチドエステルとD-型又はD-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物(式中R₁、R₂、R₃及びnは前記同様の意味である)の製造法。

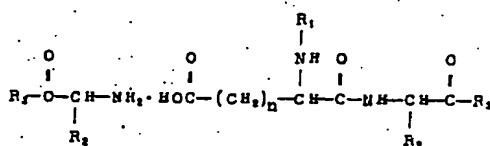
01 R₁がベンジルオキシカルボニル基であり、R₂がベンジル基であり、R₃がメトキシ基であり、nが1である特許請求の範囲第11項記載の製造法。

02 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第11項又は第12項記載の製造法。

03 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第11項乃至第13項のいずれかの項記載の製造法。

04 反応をpH5乃至8で行なう特許請求の範囲第11項乃至第14項のいずれかの項記載の

存在下で反応させ、生成したL-L-型ジペプチドエステルとL-型アミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離し、水性媒体中よりN-置換-D-モノアミノジカルボン酸を回収することを特徴とする、一般式



で表わされるL-L-型ジペプチドエステルとL-型アミノカルボン酸エステルとの付加化合物(式中R₁、R₂、R₃及びnは前記同様の意味である)の製造法。

05 R₁がベンジルオキシカルボニル基であり、R₂がベンジル基であり、R₃がメトキシ基でありnが1である特許請求の範囲第14項記載の製造法。

06 N-置換-D-L-モノアミノジカルボン酸

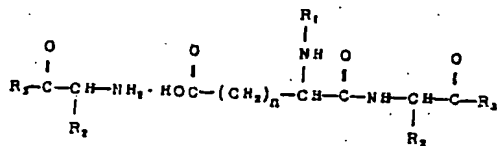
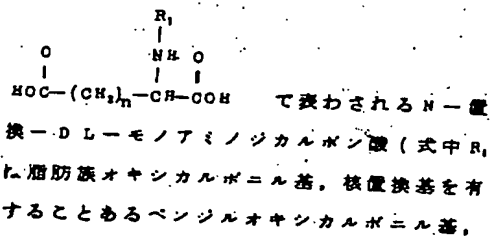
と L-アミノカルボン酸エステルとをモル比でほぼ同量用いる特許請求の範囲第 16 項又は第 17 項記載の製造法。

③ 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第 16 項乃至第 18 項のいずれかの項記載の製造法。

④ 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第 16 項乃至第 19 項のいずれかの項記載の製造法。

⑤ 反応を pH 5 乃至 8 で行なう特許請求の範囲第 16 項乃至第 20 項のいずれかの項記載の製造法。

⑥ 一般式



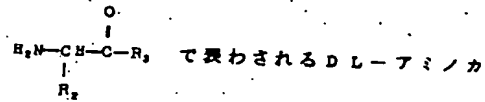
で表わされる LL-型ジペプチドエステルと D-型又は D-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物 (式中 R₁, R₂, R₃ 及び n は前記同様の意味である) の製造法。

③ R₁ がベンジルオキシカルボニル基であり、R₂ がベンジル基であり、R₃ がメトキシ基であり n が 1 である特許請求の範囲第 22 項記載の製造法。

④ N-置換-D-モノアミノジカルボン酸と D-アミノカルボン酸エステルとをモル比でほぼ同量用いる特許請求の範囲第 22 項又は第 23 項記載の方法。

⑤ 水性媒体が水溶液である特許請求の範囲第 22 項乃至第 24 項のいずれかの項記載の製造法。

特開 昭 53-92729(20)
ベンゾイル基、芳香族スルフォニル基又は芳香族スルフィニル基であり、n は 1 又は 2 である) と、一般式



で表わされる D-アミノカルボン酸エステル (式中 R₂ はメチル基、イソプロピル基、イソブチル基、イソアミル基、又はベンジル基であり、R₃ は低級アルコキシ基、ベンジルオキシ基、又はベンズヒドリルオキシ基である) とを水性媒体中蛋白分解酵素の存在下で反応させ、生成した LL-型ジペプチドエステルと D-型又は D-型に富むアミノカルボン酸エステルとの付加化合物を形成させて反応系より分離し、水性媒体中より N-置換-D-モノアミノジカルボン酸を回収することを特徴とする、一般式

③ 蛋白分解酵素が金属プロテアーゼである特許請求の範囲第 22 項乃至第 25 項記載の製造法。

④ 反応を pH 5 乃至 8 で行なう特許請求の範囲第 22 項乃至第 26 項のいずれかの項記載の製造法。

手続補正書

昭和52年10月18日

特許庁長官 眞谷 善二 殿

1. 事件の表示

昭和52年特許願第7279号

2. 発明の名称

ジブチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加化合物及びその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 代表特許出願人

住所 郵便番号 744

山口県新南陽市大字富田4568番地

名称 (358) 東洋曹達工業株式会社

代表者 青木 良吉

(通称)

郵便番号 107

東京都港区麻布1丁目7番7号(東京ビル)

東洋曹達工業株式会社 特許部部長

電話番号 東京(565)3311

4. 補正命令の日付 自発補正

5. 補正により増加する発明の数

を

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

以下の通り。なお明細書の頁数及び行数は出願当初の明細書のそれを記載したが、この明細書は手書きによるものであり、昭和52年3月24日にそのタイプ浄書を提出しているため、括弧内にタイプ浄書の頁数及び行数を付記した。

① 明細書17頁、1行

(タイプ浄書14頁、10行)の

「……BPM」を「……BPM」と訂正。

② 明細書22頁、4行

(タイプ浄書18頁、5～6行)の

「……第1吸収に」を「……第1吸収に、」

と訂正。

③ 明細書24ページ、15行

(タイプ浄書20頁、8～9行)

「面内実角並びに……」を「面内実角)並AC……」

と訂正。

得た。」と訂正。

以上

④ 明細書26頁、8行

(タイプ浄書21頁、14行)

「……L-型、D型又はD型」を

「……L-型、D-型又はD-型」と訂正。

⑤ 明細書34頁、12行

(タイプ浄書28頁、2行)

「……に対する溶解度……」を「……水に対する溶解度……」と訂正。

⑥ 明細書36頁、13～14行

(タイプ浄書29頁、13～14行)

「……はL体についてのみ起り、D体は……」

を「……はL-体についてのみ起り、D-体は……」と訂正。

⑦ 明細書38頁、9行

(タイプ浄書30頁、10行)

「はD-型の……」を「はD-型の……」と

訂正。

⑧ 明細書57頁、2行

(タイプ浄書46頁、19行)

「……6275)。」を「……6275)を

手 続 補 正 書

昭和53年 4月26日

特許庁長官 熊谷 善二 殿

1. 事件の表示

昭和52年特許願第7279号

2. 発明の名称

ジベブチド誘導体とアミノ酸誘導体との付加化合物及びその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 代表特許出願人

住所 郵便番号 746

山口県新南陽市大字雪田4560番地

名称 (330) 東洋曹達工業株式会社

代表者 青木 周 吉

(通称名)

郵便番号 107

東京都港区赤坂1丁目7番7号(東宝ビル)

東洋曹達工業株式会社 特許情報部

電話番号 東京(585)3311

4. 補正命令の日付 自発補正

5. 特許料を増加する発明の数 なし

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

以下の通り、なお明細書の頁数及び行数は出願当初の明細書のそれを記載したが、この明細書は手書きによるものであり、昭和52年3月24日にそのタイプ浄書を提出しているので、括弧内にタイプ浄書の頁数及び行数を付記した。

(1) 明細書33頁、13～14行

(タイプ浄書27頁、8行)の

「…緩衝剤…」を「…緩衝剤…」と訂正。

(2) 明細書39頁、11行

(タイプ浄書31頁、14～15行)

「…D-アミノカルボン酸…」を

「…D-アミノカルボン酸エステル…」と訂正。

(3) 明細書60ページ、11行

(タイプ浄書49頁、下から5行)

「…+7.8(…)」を「…-15.1(…)」

と訂正。